

Studi Agronomis Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.) Hasil Ko-Kultivasi Beberapa Strain *Agrobacterium tumefaciens*

Pupita Deswina dan Inez H.Slamet-Loedin

Pusat Penelitian Bioteknologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bogor

Diterima September 2010 disetujui untuk diterbitkan Januari 2011

Abstract

The transgenic rice of Cisadane and Rajalele cultivars (cv) was obtained by co-cultivation of rice callus by 4 strain *Agrobacterium tumefaciens* containing 4 different binary vector (pIG 121 Hm, pCAMBIA 1301, pTOK 233 and pMOG22 BarGus). The transgenic plantlets were acclimatized and grown in the growth chamber to investigate their agronomic characteristic in comparison to control plants. The results showed that there was no difference in the number of spikelet and seeds/spikelet among different transgenic lines co-cultivated by different strains. The number of seed/spikelet of transgenic rice cv. Rojolele and Cisadane compared to their control did not show significant difference. However, the total number of spikelet was different only for cv. Rojolele.

Key words: Co-cultivation, *Agrobacterium tumefaciens*, transgenic, transformation, agronomic characters

Pendahuluan

Tanaman padi (*Oryza sativa* L.) merupakan bahan makanan yang menghasilkan beras dan makanan pokok bagi sebagian besar penduduk Indonesia. Konsumsi beras penduduk di Indonesia mencapai 139 kg per orang per tahun (tertinggi dunia) jauh di atas rata-rata konsumsi beras dunia sebesar 60 kg per orang per tahun. Di samping rasanya yang enak, beras juga mudah diolah dan nilai energi yang terkandung didalamnya cukup tinggi. Kandungan zat gizi utama dalam beras adalah karbohidrat, tetapi yang paling banyak dalam bentuk pati 80-85%, selain itu dalam beras juga terdapat kandungan protein (FAO, 2009).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas tanaman padi mulai dari paket teknologi sederhana sampai pada teknologi rekombinan DNA. Dengan semakin berkembangnya teknologi rekayasa genetika, kemajuan di bidang ini telah berhasil melengkapi hasil-hasil dari pemuliaan tanaman. Teknologi transfer genetika saat ini menjadi salah satu teknik dasar utama yang diperlukan dalam berbagai aplikasi ilmu biologi. Salah satu teknik transformasi genetik yang telah berhasil pada tanaman padi ialah teknik melalui *Agrobacterium*.

Teknik introduksi dengan cara menyisipkan gen asing pada plasmid DNA dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens* memiliki keuntungan bahwa umumnya integrasi bersifat tunggal atau sederhana dan efisiensi transformasi lebih tinggi. Disamping itu, teknik ini relatif lebih mudah untuk diterapkan dan lebih ekonomis. Namun demikian, bakteri tersebut secara alami hanya menginfeksi kelompok tanaman dikotil, sehingga penggunaannya untuk tanaman monokotil memerlukan suatu upaya dan rekayasa lebih lanjut (Slamet – Loedin, 1994).

Keberhasilan transformasi tanaman monokotil masih sangat terbatas. Hiei *et al.* (1994) telah berhasil mentransformasi padi dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*, tetapi keberhasilannya terbatas pada padi kelompok japonica yang banyak ditanam di daerah sub tropis. Kelompok ini telah diketahui lebih responsif terhadap perlakuan kultur jaringan, sedangkan varietas-varietas padi di Indonesia termasuk dalam kelompok yang lebih rekalsitran yang disebut dengan kelompok padi javanica dan indica.

Pada awal perkembangannya teknik transformasi yang berhasil digunakan pada padi ialah teknik protoplas. Datta *et al.* (1992) melaporkan keberhasilan transformasi IR 72 dengan teknik protoplas, tetapi tanaman dari percobaan tersebut bersifat steril (pers.

comm.). Keuntungan dari sistem transformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens*, ialah tahapan kultur jaringannya lebih sedikit, integrasi gen bersifat sederhana (satu atau sedikit salinan gen), relatif lebih ekonomis dan lebih reproduksibel. Pada penelitian ini, tingkat produksi tanaman hasil transformasi *Agrobacterium* yang diperoleh dibandingkan dengan tanaman kontrol untuk mengetahui pengaruh transformasi pada fertilitas tanaman.

Materi dan Metode

Kalus yang telah diinfeksi ditanam pada media MS dengan tambahan 50 mg/l hygromycin selama 2 minggu. Kalus yang tumbuh pada media seleksi yang mengandung hygromycin diregenerasikan pada media yang mengandung 0,3 mg/l BAP dan 0,5 mg/l IAA. Planlet yang diperoleh ditransfer ke media MS.

DNA diisolasi dari planlet tanaman transgenik dan diuji dengan teknik PCR dengan menggunakan primer hpt 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan 5' - GCACTCCCCGCCTGCAC-3'

Planlet yang dihasilkan diseleksi dan dikeluarkan dari dalam botol dengan hati-hati dan ditanam dalam media tanah steril pada pot plastik yang ditutup dengan sungkup plastik selama 7 - 15 hari di dalam 'ruang tumbuh'. Plastik secara berkala dilubangi pada hari ke-10, 12, 15 sebelum diangkat seluruhnya. Selanjutnya, tanaman dipindah ke ember dengan diameter 30 cm. Tanaman dipelihara dan disiram secara teratur dan diamati pertumbuhannya sampai tanaman berproduksi dan menghasilkan benih.

Pemupukan dilakukan dua kali dengan pemberian pupuk NPK sebanyak 5 g/pot. Pemupukan pertama dimulai 15 hari setelah tanaman dipindah ke 'ruang-tumbuh' dan pemupukan kedua pada saat pembentukan primordial (bakal malai) dimulai.

Hasil dan Pembahasan

Keberhasilan ko-kultivasi tanaman padi indica dan javanica Indonesia dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* telah dilaporkan oleh Slamet-Loedin *et al.* (1994 dan 1996). Rangkuman hasil regenerasi dan aklimatisasi tanaman transgenik yang telah diperoleh dari berbagai ko-kultivasi dapat dilihat pada tabel 1. Secara rata-rata, kultivar Rojolele memiliki tingkat regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar Cisadane. Tingginya regenerasi tanaman kultivar Rojolele dibandingkan Cisadane diduga karena Rojolele berasal dari kelompok varietas javanica yang secara genetik lebih dekat dengan japonica, sedangkan Cisadane berasal dari kelompok indica. Studi tentang kelompok javanica masih sangat terbatas, tetapi telah diketahui bahwa varietas dari kelompok japonica jauh lebih responsif terhadap perlakuan kultur jaringan maupun transformasi tanaman dibandingkan dengan kelompok indica (Christou, 1994). Kesulitan yang sering dialami dari transformasi padi kelompok indica adalah pencoklatan jaringan (browning) setelah perlakuan dengan antibiotik, sehingga jumlah kalus yang beregenerasi sangat sedikit. Keberadaan gen penanda (marker gene) dalam setiap transformasi tanaman sangat diperlukan sebagai indikasi keberadaan gen target didalam jaringan (Brasileiro, 2001)

Oka (1964) menyatakan bahwa javanica adalah tropical japonica. Pengelompokan yang dilakukan oleh Glaszmann *et al.* (1987) berdasarkan hasil analisis isoenzim memasukan varietas-varietas indica pada kelompok 1 dan 2, japonica pada kelompok 6 dan javanica pada kelompok 5.

Setiap satu kalus yang mampu beregenerasi umumnya diperoleh lebih dari satu planlet. Sebagian planlet dari setiap perlakuan diaklimatisasi untuk ditumbuhkan lebih lanjut di ruang tumbuh. Persentase keberhasilan aklimatisasi yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa keberhasilan berkisar antara 38 - 100%. Rendahnya keberhasilan aklimatisasi pada beberapa varietas karena perakaran yang dihasilkan tidak seluruhnya berkembang dengan baik dan keterbatasan tempat, sehingga tanaman terlambat dipindahkan dari botol. Kemungkinan perlu dilakukan kultur air lebih dahulu untuk mengembangkan perakaran tanaman. Pada percobaan pendahuluan telah dilakukan

teknik aklimatisasi seperti yang dikembangkan di IRRI dengan menggunakan media Yoshida, namun terjadi kontaminasi jamur.

Tabel 1. Persentase regenerasi kalus dan keberhasilan aklimatisasi tanaman transgenik hasil ko-kultivasi beberapa strain *Agrobacterium*

Table 1. The percentage of callus regeneration and acclimatization of transgenic plants resulted from various *Agrobacterium* strains co-cultivation

Varietas	Strain <i>Agrobacterium</i>	Jumlah kalus resisten	Persentase kalus yang beregenerasi	Persentase keberhasilan aklimatisasi
Rojolele	PIG 121 Hm	19	10,0	48
	PCAMBIA 1301	10	40,0	100
	PTOK 233	20	30,0	100
	PMOGBarGus	10	30,0	68
Cisadane	PIG 121 Hm	20	10,0	67
	PCAMBIA 1301	29	10,0	38
	PMOGBarGus	20	20,0	50
IR 64	PIG 121 Hm	27	11,1	67
	PCAMBIA 1301	30	3,3	100
	PMOGBarGus	28	0	0

Hasil pengamatan terhadap produksi gabah isi, gabah hampa dan jumlah malai yang dihasilkan tanaman padi transgenik kultivar Rojolele dan Cisadane yang telah di ko-kultivasi dengan beberapa strain *Agrobacterium* yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata jumlah gabah dan malai yang di hasilkan tanaman transgenik hasil ko-kultivasi dengan beberapa strain *Agrobacterium* yang berbeda

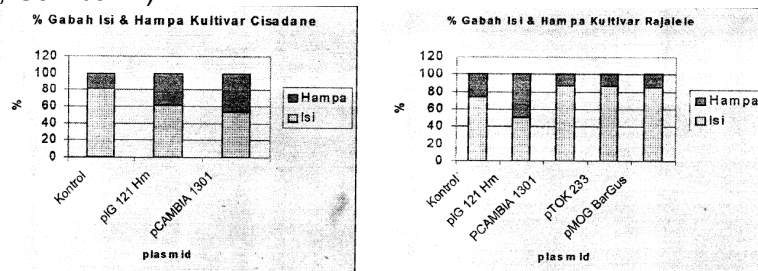
Table 2. The mean of grains and stems of transgenic plants resulted from various *Agrobacterium* strains co-cultivation

Varietas	Strain <i>Agrobacterium</i>	Rata-rata jumlah gabah isi/malai	Rata-rata jumlah gabah hampa/malai	Jumlah malai rata-rata/tanaman
Rojolele	Kontrol	67,2 ± 16	23,6 ± 8,1	14 ± 2
	PIG 121 Hm	53,4 ± 13,7	54,2 ± 19,5	9 ± 2
	PCAMBIA 1301	64,7 ± 19,7	9,7 ± 5,8	7 ± 0
	PTOK 233	43,2 ± 22,6	7,3 ± 5,3	8 ± 1
	PMOGBarGus	82,7 ± 33,3	14,6 ± 4,3	7 ± 1
Cisadane	Kontrol	88,1 ± 5,5	21,1 ± 12,9	11 ± 2
	PIG 121 Hm	94,3 ± 23,4	61,0 ± 23,7	8 ± 1
	PCAMBIA 1301	84,9 ± 26,9	74,1 ± 24,2	8 ± 0

Produksi gabah yang dihasilkan oleh tanaman transgenik hasil ko-kultivasi tersebut diatas, varietas IR 64 dan Cisadane pMOGBarGus yang semula berhasil diaklimatisasi, kemudian mati karena terserang jamur, sehingga yang bisa diamati dan dihitung produksinya adalah kultivar Rojolele yang diinfeksi oleh 4 strain berbeda dan Cisadane oleh 2 strain bakteri yang berbeda.

Jumlah rata-rata gabah isi terbanyak diperoleh dari varietas Cisadane yang diinfeksi dengan bakteri strain pIG 121 Hm sebesar 94,3 ± 23,4, sedangkan jumlah yang paling sedikit adalah varietas Rojolele dengan bakteri strain pTOK 233 sebesar 43,2 ± 22,6. Besarnya standar deviasi dari benih yang diperoleh pada malai berbeda mengakibatkan tidak berbeda nyata seluruh perlakuan, tetapi untuk rata-rata jumlah gabah hampa yang paling sedikit juga diperoleh dari varietas Rojolele dengan strain pTOK 233 sebanyak 7,3 ± 5,3 buah.

Apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol, nampak jumlah gabah yang dihasilkan baik gabah isi maupun gabah hampa tidak berbeda nyata, sedangkan persentase gabah isi yang didapat berkisar antara 50 - 87 % dan gabah hampa antara 13 - 50 % (Tabel 3, Gambar 1).



Gambar 1. Presentase gabah isi dan hampa kultivar Cisadane dan Rajalele
Figure 1. The percentage of grains of Cisadane and Rajalele cultivars

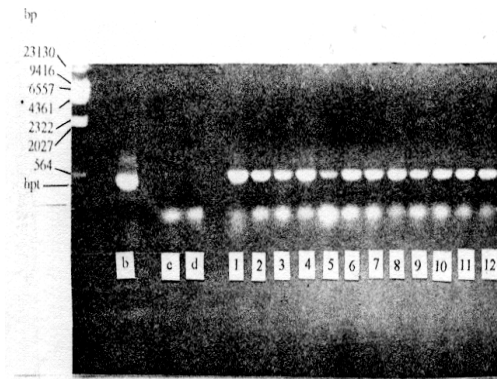
Salah satu produksi padi ditentukan oleh jumlah malai per rumpun dan persentase gabah isi (Deptan, 1977). Dilihat dari jumlah malai yang dihasilkan antar tanaman transgenik hasil ko-kultivasi vector berbeda, tidak nampak perbedaan nyata, tetapi apabila dibandingkan dengan kontrol (14 ± 2 malai) jumlah malai yang dihasilkan lebih sedikit. Jumlah malai/tanaman untuk kultivar Rajalele kontrol dan transgenik terdapat perbedaan. Malai yang di hasilkan oleh tanaman transgenik Rajalele lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol, sedangkan pada kultivar Cisadane antara tanaman transgenik dan kontrol tidak terdapat perbedaan nyata. Secara umum, tanaman transgenik yang diperoleh bersifat fertil, introduksi gen penanda dan penyeleksi tidak mempengaruhi karakter agronomis dari tanaman padi. Padi dapat dijadikan sebagai sistem model dari riset genomik saat ini, karena ukuran genom padi lebih kecil (Zhang & Wu, 1988).

Tabel 3. Persentase gabah yang dihasilkan tanaman transgenik hasil ko-kultivasi dengan strain *Agrobacterium* yang berbeda.

Table 3. The percentage of grains resulted from transgenic plants of various *Agrobacterium* strains co-cultivation

Perlakuan		Persentase Gabah(%)	
Kultivar	Plasmid	gabah isi	gabah hampa
Rajalele	Kontrol	74	26
	pIG 121Hm	50	50
	pCambia 1301	87	13
	pTOK 233	86	14
	pMOG BarGus	85	15
Cisadane	Kontrol	81	19
	pIG 121Hm	61	39
	pCambia 1301	53	47

Dari tanaman-tanaman yang berhasil diaklimatisasi diseleksi dua tanaman transgenik independen yang telah diuji terlebih dahulu dengan analisis PCR. Hasil analisis PCR pada keduanya menunjukkan bahwa tanaman-tanaman tersebut adalah tanaman transgenik yang mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin. Hasil analisis PCR dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Analisis PCR menggunakan primer hpt

Figure 2. PCR analysis using hpt primer

Keterangan:

- | | | | |
|-----|-----------------------|-------|----------------------|
| a | maker <i>HindIII</i> | 5-6 | Rajalele (pTOK 233) |
| b | control (+) | 7-8 | Rajalele (pMOGBarGu) |
| c-d | control (-) | 9-10 | Cisadane (pIG 121) |
| 1-2 | Rajalele (pIG 121Hm) | 11-12 | Cisadane (pCamb 130) |
| 3-4 | Rajalele (pCamb 1301) | | |

Kesimpulan

Hasil studi agronomis terhadap tanaman padi transgenik hasil ko-kultivasi beberapa strain yang berbeda ini menunjukkan bahwa persentase keberhasilan aklimatisasi berkisar antara 38 - 100%, sedangkan jumlah rata-rata gabah isi terbanyak diperoleh dari varietas Cisadane yang diinfeksi dengan bakteri strain pIG 121 Hm sebesar $94,3 \pm 23,4$. Jumlah yang paling sedikit adalah varietas Rajolele dengan bakteri strain pTOK 233 sebesar $43,2 \pm 22,6$. Besarnya standar deviasi dari benih yang diperoleh pada malai berbeda mengakibatkan tidak berbeda nyata seluruh perlakuan. Jumlah malai/tanaman untuk kultivar Rajolele kontrol dan transgenik terdapat perbedaan. Malai yang dihasilkan oleh tanaman transgenik Rajolele lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol, sedangkan antara tanaman transgenik kultivar Cisadane dan kontrol tidak terdapat perbedaan nyata. Penambahan gen asing dalam hal ini adalah gen penanda penyeleksi *gus A* dan higromisin tidak mempengaruhi karakter agronomis dari tanaman padi sesuai dengan yang diharapkan.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih atas bantuan teknis dari sdr. D. Purwaganda, S.Si, sdri. Yenny Andriyani dan Sri Indriyani beserta anggota group peneliti padi lainnya. Penelitian ini didanai oleh Riset Unggulan Terpadu (**RUT IV**) dan The Rockefeller Foundation.

Daftar Pustaka

- Brasileiro ACM,. Aragao FJL. 2001. Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. J Plant Biotech., 3 (3), 113-121
- Christou, P., 1994. Genetic engineering of crop legumes and cereals. Current Status and Research Advances. Netherlands.
- Datta, S.K., Datta K., Soltanifar N., Donn G., and Potryskus I., 1992. Herbicide resistant Indica Rice from IRRI breeding line IR 72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. Plant Mol. Biol., 20, 619 – 629.
- Deptan., 1977. Pedoman bercocok tanam padi, palawija, sayur-sayuran. Departemen Pertanian. Badan Pengendali Bimas, Jakarta.

- FAO. 2009. FAOSTAT database. (on line). <http://faostat.fao.org>.
- Glaszmann., J.C., 1987. Isozymes and clasification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 21 - 30.
- Hiei,Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro., T.,1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271 - 282.
- Oka., 1964. Pattern of interspecific relationship and evolutionary dynamics in *Oryza*. American–Elsevier Rice Genetics and Cytogenetics. New York.
- Slamet – Loedin, Rahayu, I.H.,W., Hutajulu, S., dan Wibowo, L.J., 1994. Penggunaan dua strain *Agrobacterium tumefaciens* super virulen untuk ko-ultivasi tanaman padi kultivar Cisadane dan Rojolele. Pros. Kongres I dan Seminar Ilmiah PBPI.
- Slamet – Loedin, I.H. , Rahayu, W. dan Prana., M.S., 1996. Transformation of javanica rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Of 3rd Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology : Issue and Choices*. Philippine.
- Zhang W and Wu R, 1988. Efficient regeneration of transgenic plants rice protoplasts and corretly regulated expression of the foreign gene in the plants. *Theor Appl. Genet.*, 76, 835-840.